

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11896

研究課題名(和文) 亜鉛徐放型チタン系フレームワークと歯髄幹細胞による顎骨再生療法

研究課題名(英文) Jaw bone regeneration therapy with zinc sustained-release titanium framework and dental pulp stem cells

研究代表者

福田 雅幸 (Masayuki, Fukuda)

秋田大学・医学部附属病院・准教授(病院教授)

研究者番号：20272049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット頭蓋骨に、歯髄幹細胞を浸潤させたシート状のコラーゲンスポンジ(type I コラーゲン)を充填し、先の研究で開発したZn-Tiフレームワークで被覆した。コントロールは、生理食塩液を浸潤させたコラーゲンスポンジをZn-Tiフレームワークで被覆した。移植後4週に試料を摘出し、骨の再生を組織学的に評価した。その結果、移植後4週の時点では、両群間の骨形成能に統計学的有意差は認められなかった。したがって、本研究においては、骨形成における促進因子は細胞成分よりフレームワークから徐放した亜鉛イオンの方が優位なのではないかと考えに至り、今後はZn-Tiフレームワークと人工骨による基礎実験に方向転換する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Zn-Tiフレームワークから亜鉛イオンを徐放することにより、歯髄幹細胞に持続的にシグナルを提供し、骨芽細胞への分化を促進させ、顎骨を再生するという画期的な治療法である。本療法の開発は、事故や腫瘍などで顎骨を失った中途障害者や日本人の平均寿命の延伸に伴い、健康な期間(健康寿命)だけでなく不健康な期間(不健康寿命)も延びることが予想される現在、高齢者にも身体的、経済的に負担の少ない医療として提供できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rats skull bone defects filled with dental pulp stem cells infiltrated collagen sponge (type I collagen) were coated with Zn-Ti framework used in the previous experiment. A collagen sponge infiltrated with physiological saline was coated with Zn-Ti framework as a control. Samples were removed to 4 weeks after transplantation, it was to evaluate the regeneration of bone histologically. As a result, at the time of 4 weeks after the transplantation, no statistically significant difference osteogenic potential between the two groups was observed. Therefore, in this study, it was considered that zinc ions released slowly from the framework are more useful than cell components as a promoting factor for bone formation. In the future, we will shift to basic experiments using the Zn-Ti framework and artificial bones.

研究分野：口腔外科学

キーワード：亜鉛徐放型チタン 顎骨再生療法 歯髄幹細胞 フレームワーク

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨再建、特に顎骨再建に使用されているフレームワークの多くはチタンあるいはチタン合金製で、生体内で安定しているため、それらを用いた顎骨再建は予知性の高い治療法として広く認識されている。申請者は、骨芽細胞への分化・増殖を反応触媒のように促進する因子として生体内に微量に存在する亜鉛イオンに注目し、**亜鉛徐放型チタン系インプラント**を作製した(図1)(Alvarez K, Fukuda M, Yamamoto O: Titanium implants after alkali heating treatment with a  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  complex: analysis of interfacial bond strength using push-out tests. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 12, e114-125, 2010)。本材料から徐放された亜鉛イオンは、**材料周囲の細胞を骨芽細胞へ分化・増殖させ、さらに石灰化を促進させることが判った**(Yusa K, Yamamoto O, Fukuda M, et al.: In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412, 273-278, 2011)。そこで、本技術を顎骨再生療法に発展させるため、チタンメッシュに應用して作製したフレームワーク(Zn-Ti フレームワーク)を用い、ラット頭蓋骨欠損モデルによる骨形成能のスクリーニングを行ってきた(図2)。本実験は、ラットの頭蓋骨に、トレフィンバーを用いて直径8mmのcritical size(自然に治癒しない大きさ)の骨欠損を形成し、シート状のコラーゲンスポンジ(type コラーゲン)を充填し、Zn-Ti メッシュで被覆するものである。対照として、Ti メッシュを使用する。移植後2および4週に試料を摘出し、骨の再生を組織学的に評価した。しかし、**細胞成分をまったく用いない本実験では、コントロールに用いたTiとZn-Ti フレームワークとの間には骨再生率に有意な差はみられなかった**(図3)。

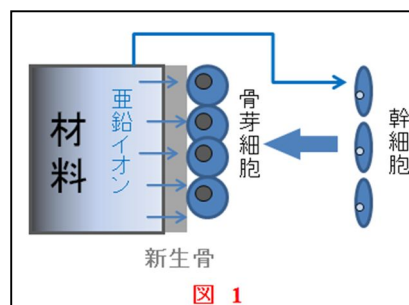


図 1

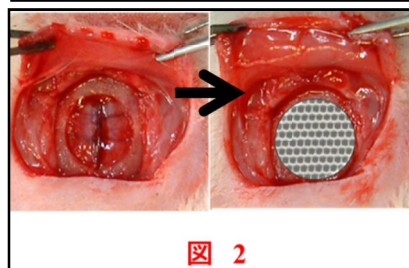


図 2

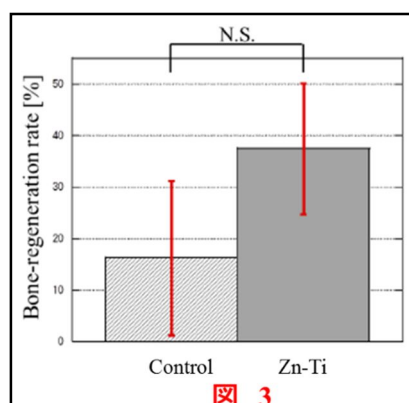


図 3

### 2. 研究の目的

申請者は、前述のラット頭蓋骨欠損モデルによる骨形成能のスクリーニングの結果を踏まえ、顎骨再生療法に用いる細胞成分についての研究も同時に行ってきた。申請者は、連携研修者の山形大学医学部の遊佐和之助教とともに、口腔内から簡単に採取できる細胞を用いた安全な骨再生療法の開発のために、**歯髄幹細胞に関する研究を行っている**(Yusa K, Yamamoto O, Takano H, Fukuda M, Iino M: A zinc-modified titanium surface enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Scientific Reports* 6, 29462, 2016. Yusa K, Yamamoto O, Iino M, Takano H, Fukuda M, et al.: Eluted zinc ions stimulate osteoblast differentiation and mineralization in human dental pulp stem cells for bone tissue engineering. *Archives of Oral Biology* 71: 162-169, 2016)。

近年、歯髄の中に歯髄幹細胞が存在することが明らかとなり、この幹細胞は歯周病などの歯科に関連する組織再生はもとより、難治性疾患(心筋梗塞・脊髄損傷・パーキンソン病など)への応用が可能と言われている。申請者は、この歯髄幹細胞とZn-Ti フレームワークを用いた顎骨再生療法は、**従来の方法に比べて、患者への侵襲が少なく、治療期間の短縮や、感染症などの危険も減らすことができると考えている**。申請者は、すでに亜鉛イオン(EZ)による歯髄幹細胞の骨芽細胞分化促進作用に関する研究を始めており、亜鉛イオンの添加によりALP染色の増強やmRNA発現の上昇を確認している(図4)。本研究期間では、Zn-Ti フレームワーク内に歯髄幹細胞を移植し、顎骨再生に最適な療法の開発に挑む。

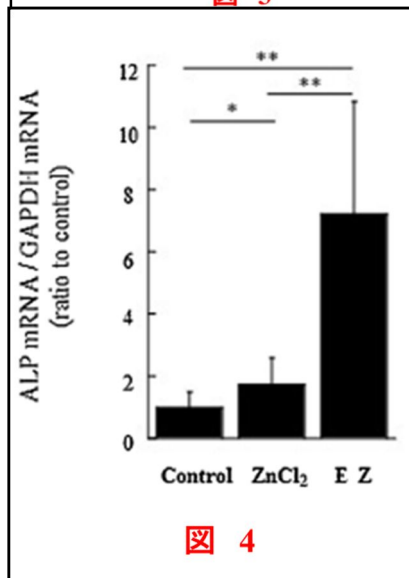
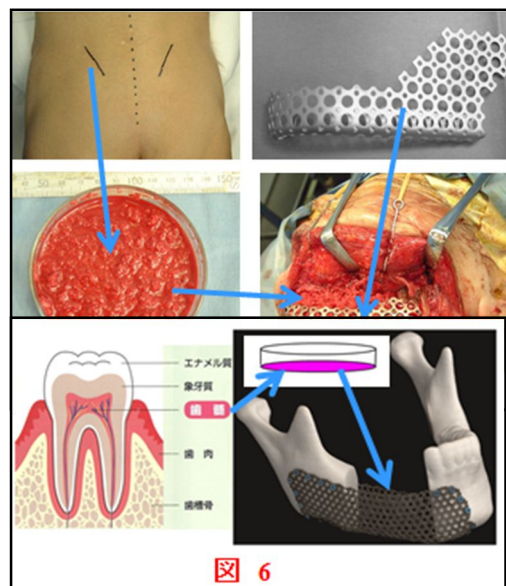


図 4

顎骨再建治療は、顎骨の水平的、垂直的骨量の不足に対してチタンメッシュおよび自家骨を用いた骨造成(増生)がいまだにゴールドスタンダードである(図5)。一方、これらの術式は経時的な骨吸収や自家骨採取にともなう健全なドナーサイトへの侵襲という大きな問題を抱えており、新たなスキヤフォールドとしてのフレームワークの創製と細胞ソースの應用が期待されている。生体内微量元素の一つである亜鉛は、種々の細胞の分化および増殖を制御するとともに、

骨芽細胞分化における成長因子の一つであることが報告されている。また、本研究に用いる歯髄幹細胞は、口腔内から簡単に採取できるため、安全で安心な骨再生療法の開発のために、極めて有望である(図6)。

本研究は、Zn-Ti フレームワークから亜鉛イオンを徐放することにより、歯髄幹細胞に持続的にシグナルを提供し、骨芽細胞分化を促進させ、顎骨を再生するという画期的な治療法であり、本療法の開発は、事故や腫瘍などで顎骨を失った中途障害者や日本人の平均寿命の延伸に伴い、健康な期間(健康寿命)だけではなく、不健康な期間(不健康寿命)も延びることが予想される現在、高齢者にも身体的、経済的に負担の少ない医療として提供できるものと確信する。



### 3. 研究の方法

#### 1. 亜鉛徐放型チタン系 (Zn-Ti) フレームワークの作製と歯髄幹細胞の挙動評価

##### 1) Zn-Ti フレームワーク作製

材料には、純度 99.5% のチタンメッシュ (直径 10mm、厚さ 1mm) を使用する。以後の実験では、未処理のチタン (Ti) をコントロールとして使用する。表面処理は、テトラヒドロキシ亜鉛酸錯体を含む水溶液を用いる ( $\text{NaOH} + \text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Zn}(\text{OH})_2\downarrow + \text{NaOH} \rightarrow \text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$ ) (Alvarez K, Fukuda M, Yamamoto O: Titanium implants after alkali heating treatment with a  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  complex: analysis of interfacial bond strength using push-out tests. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 12, e114-125, 2010)。材料のチタンメッシュをこの錯体水溶液に 24 時間浸漬し、Zn-Ti フレームワークを作製する。試料の表面性状をレーザー顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察する。次に、Zn-Ti フレームワークおよびコントロールへ 3 $\mu\text{l}$  の超純水を滴下し、接触角を測定し、表面ぬれ性を評価する。また、Zn-Ti フレームワークを PBS 中に浸漬し、徐放した亜鉛濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES: Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry) を用いて測定する。

##### 2) 細胞培養

接着培養分離法により得られた歯髄幹細胞を標準培地(10%FBS 添加 DMEM)で培養し、細胞の間葉系幹細胞マーカー (CD44、CD73) および造血系幹細胞マーカー (CD14、CD45) の発現をフローサイトメーター (FACS) で測定する。Zn-Ti フレームワークおよびコントロール上に歯髄幹細胞を播種し、10mM $\beta$ -グリセロリン酸、0.28mM アスコルビン酸、100nM デキサメタゾン含有骨芽細胞誘導培地により骨芽細胞分化誘導を行う。

##### 3) 細胞増殖能の評価

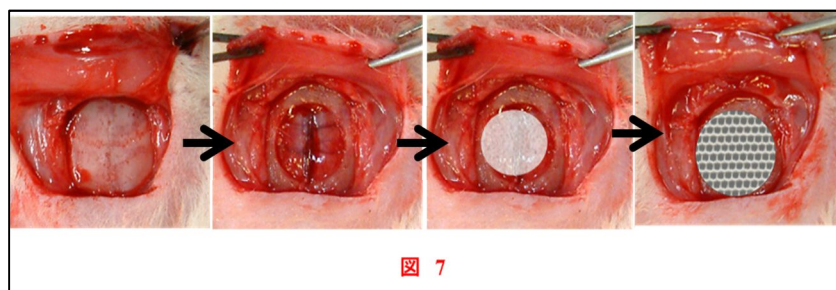
Zn-Ti フレームワークおよびコントロール上に歯髄幹細胞 (1500cell/cm<sup>2</sup>) を播種し、培養 1、3、5、7 日目の細胞増殖能を MTS assay kit を用いて評価する。

##### 4) 骨芽細胞分化能の評価

Zn-Ti フレームワークおよびコントロール上で培養した歯髄幹細胞に関して、培養 3 日目および 7 日目の ALP 活性を測定する。また、骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現を real-time PCR 法で測定する。培養 48 時間後の Smad1、Smad4、p-Smad1/5/8 のタンパク発現をウエスタンブロットで検索する。また、培養 10 日目、21 日目における基質石灰化をアリザリンレッド S 染色で評価する。

#### 2. Zn-Ti フレームワーク周囲の骨形成能のスクリーニング

ラットの頭蓋骨に、トレフィンバーを用いて直径 8mm の critical size (自然に治癒しない大きさ) の骨欠損を形成する。この骨欠損に、細胞数を変化させた歯髄幹細胞を浸潤させたシート状のコラーゲンスポンジ (typeIコラーゲン) を充填し、実験 1 で用いた Zn-Ti フレームワークで被覆する(図7)。



コントロールは、生理食塩水を浸潤させたコラーゲンスポンジを Zn-Ti フレームワークで被覆する。移植後 4 週に試料を摘出し、骨の再生を組織学的に評価する。骨の新生速度は、非脱灰切片を作製し、トルイジンブルー染色等を行い NIH Image を用いて新生骨形成率を求める。なお、上記の実験でコントロールと有意な差が検出できない場合には、移植細胞数等を調整し、再度検討

を重ねる。

#### 4. 研究成果

##### 1. Zn-Ti フレームワークの作製と歯髄幹細胞の挙動評価

1) Zn-Ti フレームワークの作製：Zn-Ti 表面にはナノスケールの小孔が確認され、Zn-Ti において接触角の低下（親水性の亢進）が認められた。実験 7 日目までに、Zn-Ti より徐放された亜鉛濃度は  $3.39 \pm 1.18 \mu\text{M}$  であり、細胞毒性が生じる濃度を下回った（図 8）。

2) 細胞培養：歯髄幹細胞における表面抗原の発現は間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD73 陽性、造血幹細胞マーカーである CD14、CD45 陰性であった。

3) 細胞増殖能の評価：コントロールと Zn-Ti で細胞増殖に有意な差は認めなかった。

4) 骨芽細胞分化能の評価：Zn-Ti 上で培養した歯髄幹細胞は、Control と比較して培養 3 日目および 7 日目ともに有意な ALP 活性の増強を認めた（図 9）。培養 3 日目および 7 日目の real time PCR では、Zn-Ti 群において骨芽細胞分化マーカーである type I collagen、BMP2、ALP、Runx2、OPN の有意な mRNA 発現の増強を認めた。また、血管内皮増殖因子である VEGF-A の mRNA は、骨芽細胞分化に伴い発現が上昇するとともに骨芽細胞分化を増強させることが報告されているが、Zn-Ti 群において VEGF-A の mRNA 発現も上昇していることが確認された。Smad1、Smad4 の発現に著明な差は認めなかったが、Zn-Ti 群で p-Smad1/5/8 の発現の増強を認めた。培養 10 日目、21 日目のアリザリンレッド染色を行ったサンプルに関してサンプルの溶解後に吸光度測定を行ったところ、Zn-Ti 群で有意な基質石灰化の増強が確認された。（図 10）

##### 2. Zn-Ti フレームワーク周囲の骨形成能のスクリーニング

コラーゲンスポンジに歯髄幹細胞を浸潤させた群と生理食塩液を浸潤させた群を Zn-Ti フレームワークで被覆した実験を行った。しかし、移植後 4 週の時点で両群間の骨形成能に統計学的有意差は認められなかった。したがって、本研究においては、骨形成における促進因子は細胞成分よりフレームワークから徐放した亜鉛イオンの方が優位なのではないかと考えに至り、今後は Zn-Ti フレームワークと人工骨による基礎実験に方向転換することとなった。

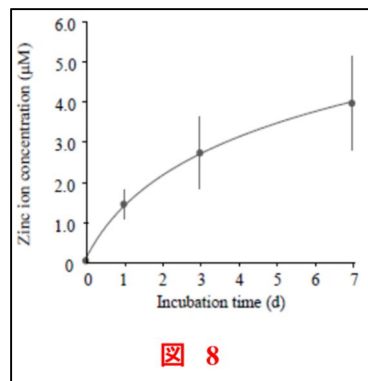


図 8

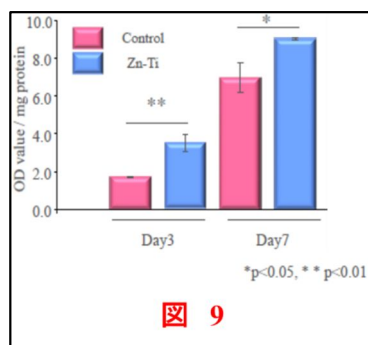


図 9

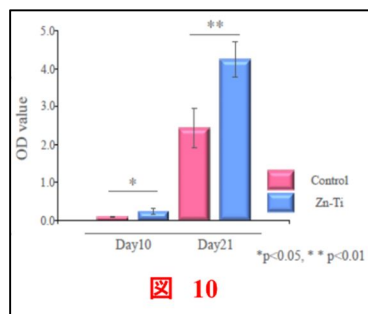


図 10

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawai T, Kamakura S, Matsui K, Fukuda M, Takano H, Iino M, Ishikawa S, Kawana, H, Soma T, Imamura E, Kizu, H, Michibata, A, Asahina I, Miura K, Nakamura N, Kibe T, Suzuki O, Takahashi T	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical study of octacalcium phosphate and collagen composite in oral and maxillofacial surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2041731419896449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi H, Fukuda M, Fukuchi M, Konno Y, Yamazaki M, Takano H	4. 巻 108
2. 論文標題 Abscopal effect of radiation therapy after nivolumab monotherapy in oral mucosal melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 104919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2020.104919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Konno Y, Fukuda M, Suzuki S, Ohbuchi M, Igarashi H, Yamazaki M, Nakata A, Takano H	4. 巻 32
2. 論文標題 Mandibular ameloblastoma with papillary hyperplasia in the gingiva	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 281-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2020.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 1.Obuchi M, Kimura T, Nishikawa T, Horiguchi T, Fukuda M, Masaki Y	4. 巻 126
2. 論文標題 Neuroprotective effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, after spinal cord ischemia and reperfusion in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesia & Analgesia	6. 最初と最後の頁 815-823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000002602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki M, Fukuda M, Nakata A, Nanjo H, Takano H	4. 巻 30
2. 論文標題 Solitary oncocytoma of the submandibular salivary gland	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 281-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi H, Fukuda M, Nakata A, Konno Y, Yamazaki M, Takano H	4. 巻 30
2. 論文標題 Teratoid cyst of the sublingual region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 504-507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山崎雅人, 高野裕史, 今野泰典, 福田雅幸
2. 発表標題 口腔癌治療後のインプラント治療の有用性についての臨床的検討
3. 学会等名 第43回頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福地峰世, 高野裕史, 鈴木昇建, 下田悟士, 鈴木兼一郎, 五十嵐秀光, 山崎雅人, 福田雅幸
2. 発表標題 上顎切除後に広範囲顎骨支持型補綴にて咬合再建を行った3症例
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田雅幸
2. 発表標題 「広範囲顎骨支持型装置および補綴」の現状と今後の展望
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎雅人，高野裕史，鈴木昇健，石田 昂，鈴木兼一郎，福地峰世，五十嵐秀光，福田雅幸
2. 発表標題 当科における広範囲顎骨支持型装置の臨床的検討
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野裕史，中田 憲，五十嵐秀光，今野泰典，福地峰世，鈴木兼一郎，下田悟士，鈴木昇建，山崎雅人，福田雅幸
2. 発表標題 口腔癌切除後にカスタムメイドチタンメッシュトレーと腸骨骨髓海綿骨細片を用いた下顎骨再建症例の臨床的検討
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野裕史
2. 発表標題 「広範囲顎骨支持型装置および補綴」適用の現状と機能評価
3. 学会等名 第23回日本顎顔面インプラント学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takano H, Yamazaki M, Suzuki K, Fukuda M
2. 発表標題 Clinical investigation of rehabilitation with dental implants following resection of oral cancer with radiation therapy
3. 学会等名 the Pan Pacific Implant Society (PPIS) Winter Meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野裕史, 福田雅幸
2. 発表標題 カスタムメイドチタンメッシュトレーと腸骨骨髓海綿骨を用いた下顎骨再建の実際
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸
2. 発表標題 広範囲顎骨支持型装置の臨床的検討
3. 学会等名 第22回日本顎顔面インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田 憲, 高野裕史, 石田 昂, 福地峰世, 小澤 諒, 五十嵐秀光, 今野泰典, 山崎雅人, 桑島精一, 福田雅幸
2. 発表標題 再建用チタンプレートとオーダーメイドチタントレーを併用した下顎骨再建術の有用性に関する臨床的検討
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 山崎雅人, 高野裕史, 五十嵐秀光, 今野泰典, 中田 憲, 福田雅幸
2. 発表標題 当科における広範囲顎骨支持型装置の臨床的検討
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中田 憲, 高野裕史, 石田 昂, 五十嵐秀光, 今野泰典, 山崎雅人, 福田雅幸
2. 発表標題 再建用チタンプレートとオーダーメイドチタントレーを併用した下顎骨再建術後に行った歯科インプラント治療に関する臨床的検討
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田雅幸
2. 発表標題 ULTRA FLEX MESH CUSTOM <sup>®</sup> を用いた下顎骨再建
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akagi M, Tanaka K, Fukuda M, Naganawa A
2. 発表標題 Development of Blinking Epithese
3. 学会等名 2017 the International Conference on Robotics and Mechantronics (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高野 裕史  (Takano Hiroshi)  (30282172)	秋田大学・医学部附属病院・講師(病院准教授)   (11401)	
研究分担者	山本 修  (Yamamoto Osamu)  (00230540)	山形大学・大学院理工学研究科・教授   (11501)	
研究分担者	遊佐 和之  (Yusa Kazuyuki)  (80636960)	山形大学・医学部・助教   (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------